

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 507**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2013 E 18193794 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **13.03.2024 EP 3447495**

54 Título: **Prueba de Papanicolaou para cánceres de ovario y de endometrio**

30 Prioridad:

29.10.2012 US 201261719942 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
15.11.2024

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**KINDE, ISAAC;
KINZLER, KENNETH, W.;
VOGELSTEIN, BERT;
PAPADOPOULOS, NICKOLAS;
DIAZ, LUIS;
BETTEGOWDA, CHETAN y
WANG, YUXUAN**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 886 507 T5

DESCRIPCIÓN

Prueba de Papanicolaou para cánceres de ovario y de endometrio

5 La presente invención se realizó con fondos del Instituto Nacional del Cáncer y de los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno de los Estados Unidos conserva ciertos derechos según los términos del contrato del NCI, N01-CN-43309 y las subvenciones de los NIH, CA129825 y CA43460.

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

10

La presente invención se refiere al área del cribado del cáncer. En particular, se refiere al cáncer de ovario.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Desde la introducción de la prueba de Papanicolaou, la incidencia y la mortalidad del cáncer de cuello uterino en poblaciones cribadas se ha reducido en más de un 75 % (1, 2). En contraste, las muertes por cánceres de ovario y de endometrio no han disminuido sustancialmente durante ese mismo período de tiempo. Como resultado, más de 69.000 mujeres en los Estados Unidos serán diagnosticadas con cáncer de ovario y de endometrio en 2012. Aunque el cáncer de endometrio es más común que el cáncer de ovario, este último es más mortal. En los Estados Unidos se espera que aproximadamente 15.000 y 8.000 mujeres mueran cada año de cáncer de ovario y de endometrio, respectivamente (tabla 1). En todo el mundo, se esperan más de 200.000 muertes por estos tumores solo este año (3, 4).

25 En un esfuerzo por replicar el éxito del cribado del cáncer de cuello uterino, se han ideado varios enfoques para la detección temprana de los cánceres de endometrio y de ovario. Para los cánceres de endometrio, los esfuerzos se han centrado en la citología y la ecografía transvaginal (TVS). La citología puede indicar, de hecho, una neoplasia dentro del útero en algunos casos, aunque con baja especificidad (5). La TVS es una técnica no invasiva para medir el grosor del endometrio basada en el hecho de que los endometrios que albergan un cáncer son más gruesos que los endometrios normales (6). Al igual que con la citología, la medición de cribado del grosor endometrial utilizando TVS carece de especificidad suficiente porque las lesiones benignas, tales como los pólipos, también pueden producir un endometrio engrosado. Por consiguiente, ni la citología ni la TVS cumplen los requisitos para una prueba de cribado (5, 7).

35 Se han hecho esfuerzos aún mayores para desarrollar una prueba de cribado del cáncer de ovario, utilizando niveles séricos de CA-125 y TVS. CA-125 es una glucoproteína transmembrana de alto peso molecular expresada por epitelios derivados de celómicos y müllerianos que es elevada en un subconjunto de pacientes con cáncer de ovario con enfermedad en estadio temprano (8). La especificidad de CA-125 está limitada por el hecho de que también es elevada en una variedad de afecciones benignas, tales como la enfermedad inflamatoria pélvica, la endometriosis y los quistes de ovario (9). La TVS puede visualizar el ovario pero solo puede detectar tumores grandes y no puede distinguir definitivamente tumores benignos de tumores malignos. Se han realizado varios ensayos clínicos de cribado utilizando CA-125 sérica y TVS, pero ninguno ha demostrado un beneficio de supervivencia. De hecho, algunos han mostrado un aumento en la morbilidad en comparación con los controles debido a que las pruebas falsas positivas desencadenan una evaluación adicional mediante laparoscopia o laparotomía exploratoria (10-12). El documento US2005/136405A1 sugiere un método para detectar biomarcadores de cáncer de ovario o cáncer de endometrio en un frotis de Papanicolaou. Sin embargo, no proporciona ninguna información técnica sobre cómo identificar mutaciones raras relacionadas con el cáncer de ovario o endometrio en muestras de cuello uterino.

50 Por consiguiente, la U.S. Preventative Services Task Force, la American Cancer Society, el American Congress of Obstetricians and Gynecologists, así como la National Comprehensive Cancer Network, no recomiendan el cribado de rutina para los cánceres de endometrio u ovario en la población general. De hecho, estas organizaciones advierten que "los daños potenciales son mayores que los beneficios potenciales" (13-16). Se ha hecho una excepción a esta recomendación para pacientes con una predisposición hereditaria al cáncer de ovario, tales como aquellas con mutaciones de línea germinal en un gen BRCA o aquellas con síndrome de Lynch. Se recomienda que las portadoras de la mutación BRCA se sometan a un cribado cada 6 meses con TVS y CA-125 sérica, a partir de una edad relativamente temprana. Las pautas de cribado para las mujeres con síndrome de Lynch incluyen el muestreo endometrial anual y las TVS entre los 30 y los 35 años (15, 17).

60 La mortalidad asociada con neoplasias ginecológicas no detectadas ha hecho que el desarrollo de una herramienta de cribado efectiva sea una alta prioridad. Una observación importante que inspiró el estudio actual es que las mujeres asintomáticas ocasionalmente presentan células glandulares atípicas (AGC) detectadas en una muestra de citología como parte de su procedimiento rutinario de cribado del cáncer de cuello uterino. Aunque las AGC se asocian con enfermedad premaligna o maligna en algunos casos (18-22), a menudo es difícil distinguir las AGC que surgen de cáncer endocervicouterino, de endometrio o de ovario entre sí o de afecciones más benignas. Existe una necesidad continua en la técnica de detectar estos cánceres en un estadio más temprano de lo que se hace actualmente.

65

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método tal y como se define en las reivindicaciones de la 1 a la 13 anexas.

Otro aspecto de la invención es un kit tal y como se define en las reivindicaciones de la 14 a la 19 anexas.

Estas y otras realizaciones que serán evidentes para los expertos en la materia al leer la memoria descriptiva proporcionan a la técnica procedimientos para evaluar el cáncer de ovario en un entorno de cribado utilizando muestras que ya se recogen de forma rutinaria.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Demostración esquemática de las etapas principales del procedimiento descrito en este estudio. Las células tumorales que se desprenden de los cánceres de ovario o endometrio son transportadas hacia el canal endocervicouterino. Estas células se pueden capturar con el cepillo que se utiliza para realizar un frotis de Papanicolaou de rutina. El contenido del cepillo se transfiere a un fijador líquido, a partir del cual se aísla el ADN. Utilizando secuenciación de nueva generación, se consulta este ADN para detectar mutaciones que indiquen la presencia de una neoplasia en el aparato reproductor femenino.

Figura 2. Diagrama del ensayo utilizado para detectar simultáneamente mutaciones en 12 genes diferentes. Se representa una modificación del protocolo Safe-SeqS (Safe-Sequencing System), para la interrogación simultánea de múltiples mutaciones en una sola muestra. En el procedimiento Safe-SeqS estándar, solo se evalúa un amplicón, mientras que el nuevo sistema se utiliza para evaluar múltiples amplicones de múltiples genes de una vez.

Figura 3. Fracciones de alelos mutantes en fluidos de frotis de Papanicolaou. Se representa la fracción de alelos mutantes de cada uno de los 46 frotis de Papanicolaou. El estadio de cada tumor se enumera en el eje Y. El eje X demuestra el % de fracción de alelo mutante según lo determinado por Safe-SeqS.

Figura 4. Mapa de calor que muestra los resultados de las pruebas múltiplex de 12 genes en fluidos de frotis de Papanicolaou. Cada bloque en el eje y representa un bloque de secuencia de 30 pb del gen indicado. Las 28 muestras evaluadas (14 de mujeres con cáncer, 14 de mujeres normales sin cáncer) están indicadas en el eje x. Las mutaciones se indican como bloques de colores, con el blanco indicando que no hay mutación, el amarillo indicando una fracción mutante del 0,1 % al 1 %, el naranja indicando una fracción mutante del 1 % al 10 % y el rojo indicando una fracción mutante de >10 %.

Figura 5. Tabla 1. Epidemiología de los tumores de ovario y endometrio. Se enumeran los números estimados de nuevos casos y muertes en los Estados Unidos de los subtipos principales de cánceres de ovario y de endometrio.

Figura 6. Tabla 2. Características genéticas de los cánceres de ovario y de endometrio. Se enumeran las frecuencias de los genes comúnmente mutados en los cánceres de ovario y de endometrio.

Figura 7. Tabla S1. Cánceres de endometrio (subtipo endometriode) estudiados mediante secuenciación de todo el exoma. Se enumeran las características resumidas de los 22 cánceres utilizados para la secuenciación del exoma.

Figura 8. Tabla S3. Mutaciones evaluadas en frotis de Papanicolaou. Se enumeran las características clínicas de las 46 muestras tumorales, junto con la mutación identificada en cada caso y la fracción de alelos mutantes identificados en los frotis de Papanicolaou.

Figura 9. Tabla S4. Cebadores utilizados para evaluar mutaciones individuales en frotis de Papanicolaou. Las secuencias de los cebadores directo e inverso utilizados para poner a prueba cada mutación mediante Safe-SeqS se enumeran en pares (SEQ ID NO: 4-99, respectivamente).

Figura 10. Tabla S5. Cebadores utilizados para evaluar simultáneamente 12 genes en frotis de Papanicolaou. Las secuencias de los cebadores directo e inverso para cada región puesta a prueba se enumeran en pares (SEQ ID NO: 100-191, respectivamente).

Figura 11. Tabla S6. Mutaciones identificadas en frotis de Papanicolaou a través de la evaluación simultánea de 12 genes. Se enumera la fracción de alelos mutantes identificados en los frotis de Papanicolaou que utilizan este enfoque, junto con las mutaciones precisas identificadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los presentes inventores han desarrollado una prueba para detectar diferentes cánceres utilizando muestras que ya se recogen de manera rutinaria para diagnosticar el cáncer de útero y la infección por VPH (virus del papiloma humano). Utilizando un panel de genes, se consiguió un alto nivel de detección de cánceres tanto de endometrio

como de ovario.

Ciertos genes se han identificado como mutados en una alta proporción de cánceres de endometrio y de ovario. Estos incluyen *CTNNB1*, *EGFR*, *PI3KCA*, *PTEN*, *TP53*, *BRAF*, *KRAS*, *AKT1*, *NRAS*, *PPP2R1A*, *APC*, *FBXW7*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *MLL2*, *RFF43* y *FGFR2*. La prueba se puede realizar, como mínimo en 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 de estos genes. Además, se pueden añadir o sustituir otros genes en el panel para conseguir una mayor tasa de detección.

Se pueden realizar pruebas para detectar una mutación mediante el análisis de ácidos nucleicos, tales como ADN o ARNm o ADNc. Los analitos de ácido nucleico se aíslan a partir de células o fragmentos de células que se encuentran en la muestra líquida de frotis de Papanicolaou. Las pruebas adecuadas pueden incluir cualquier ensayo basado en hibridación o secuenciación.

Los cambios genéticos que pueden detectarse son normalmente mutaciones tales como deleciones, inserciones, duplicados, sustituciones (mutaciones de sentido alterado o sin sentido), reordenamientos, etc. Dichas mutaciones pueden detectarse, entre otras cosas, comparando un tipo silvestre en otro tejido o fluido (no tumoral) de un individuo o mediante la comparación con secuencias de referencia, por ejemplo, en bases de datos. Las mutaciones que se encuentran en todos los tejidos de un individuo son mutaciones de la línea germinal, mientras que las que se producen solamente en un solo tejido son mutaciones somáticas. También se pueden detectar cambios epigenéticos. Estos pueden ser pérdida o ganancia de metilación en ubicaciones específicas en genes específicos, así como modificaciones de histonas, que incluyen acetilación, ubiquitilación, fosforilación y sumoilación.

Las pruebas se pueden realizar en un formato múltiple, en el que se utiliza un solo recipiente de reacción para detectar múltiples analitos. Los ejemplos de dichas pruebas incluyen amplificaciones que utilizan conjuntos de cebadores múltiples, amplificaciones que utilizan cebadores universales, hibridación o amplificación basada en matrices, amplificación basada en emulsión.

Aunque las sondas y los cebadores pueden diseñarse para interrogar mutaciones particulares o partes particulares de un gen, ARNm o ADNc, estas pueden no ser entidades separadas. Por ejemplo, las sondas y los cebadores pueden enlazarse entre sí para formar un concatámero, o se pueden enlazar a uno o más soportes sólidos, tal como una perla o una matriz.

Los kits para utilización en los procedimientos dados a conocer pueden incluir un portador para los diversos componentes. El portador puede ser un recipiente o soporte, en forma de, por ejemplo, bolsa, caja, tubo, gradilla, y está opcionalmente compartimentado. El kit también incluye varios componentes útiles para detectar mutaciones, utilizando las técnicas de detección mencionadas anteriormente. Por ejemplo, el kit de detección puede incluir uno o más oligonucleótidos útiles como cebadores para amplificar todos o una parte de los ácidos nucleicos diana. El kit de detección también puede incluir una o más sondas de oligonucleótidos para la hibridación con los ácidos nucleicos diana. Opcionalmente, los oligonucleótidos se fijan a un soporte sólido, por ejemplo, se incorporan en una micromatriz incluida en el kit o suministrada por separado.

Los soportes sólidos pueden contener un solo cebador o sonda o anticuerpo para detectar un solo gen, proteína, ARNm o parte de un gen. Un soporte sólido puede contener múltiples cebadores, sondas o anticuerpos. Pueden proporcionarse como un grupo que interrogará mutaciones, como mínimo en 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 de los genes del panel deseado. El panel puede seleccionarse entre *CTNNB1*, *EGFR*, *PI3KCA*, *PTEN*, *TP53*, *BRAF*, *KRAS*, *AKT1*, *NRAS*, *PPP2R1A*, *APC*, *FBXW7*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *MLL2*, *RFF43* y *FGFR2* o comprender los mismos.

Se pueden utilizar pares de cebadores para sintetizar amplicones de diversos tamaños. Los amplicones pueden ser, por ejemplo, de 50, 60, 75, 100, 125, 150, 200, 140, 180 pb de longitud. Los amplicones pueden llegar hasta 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000 pb de longitud, como ejemplos. El tamaño del amplicón puede estar limitado por el tamaño y/o la calidad del modelo recuperado a partir del frotis de Papanicolaou líquido. Las sondas y los cebadores para la utilización en la presente invención pueden contener una secuencia de tipo silvestre o pueden contener una secuencia de un mutante particular.

En una realización, la prueba se puede realizar utilizando muestras que se recogen a lo largo del tiempo. Los resultados de la prueba se pueden comparar para cambios cuantitativos o cualitativos. Dicho análisis se puede utilizar después de una terapia potencialmente curativa, tal como cirugía.

Georgios Papanicolaou publicó su trabajo seminal, titulado ("Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear") "Diagnóstico del cáncer de útero mediante frotis vaginal", en 1943 (31). En ese momento, sugirió que el muestreo endocervicouterino podría, *en teoría*, utilizarse para detectar no solo los cánceres de cuello uterino, sino también otros cánceres que surgen en el aparato reproductor femenino, incluidos los carcinomas endometriales. La investigación notificada en este contexto nos acerca mucho más a ese objetivo. En honor a la contribución pionera de Papanicolaou al campo de la detección temprana del cáncer, se ha denominado el enfoque descrito en este contexto la prueba "PapGene".

Uno de los desarrollos más importantes en los últimos años es el reconocimiento de que todos los cánceres humanos son el resultado de mutaciones en un conjunto limitado de genes y un conjunto aún más limitado de vías a través de las cuales estos genes actúan (32). Los datos de secuenciación de todo el exoma que se presentan, combinados con estudios anteriores de todo el genoma, proporcionan un ejemplo sorprendente de las características genéticas comunes del cáncer (figura 6, tabla 2). A través del análisis de regiones particulares de solo 12 genes (figura 10, tabla S5), se pudo detectar, como mínimo, una mutación conductora en la gran mayoría de nueve cánceres ginecológicos diferentes (figura 5, tabla 1). Aunque varios de estos 12 genes eran supresores de tumores y, por lo tanto, difíciles de convertir en diana terapéuticamente, el conocimiento de sus patrones mutacionales brinda oportunidades sin precedentes para el diagnóstico del cáncer.

El descubrimiento más importante en este artículo es que cantidades importantes de células o fragmentos de células de cánceres de endometrio y de ovario están presentes en el cuello uterino y pueden detectarse a través de enfoques genéticos moleculares. La detección de células malignas de carcinomas de endometrio y de ovario en muestras de citología de cuello uterino es relativamente poco frecuente. El examen microscópico no siempre puede distinguir entre sí, de carcinomas de cuello uterino o afecciones más benignas. El estudio de los presentes inventores demostró que el 100 % de los cánceres de endometrio (n=24), incluso los de baja malignidad, y el 41 % de los cánceres de ovario (n=22), diseminan células al cuello uterino que podrían detectarse a partir de muestras recogidas como parte de frotis de Papanicolaou de rutina. Este descubrimiento, junto con los avances técnicos que permiten la detección fiable de mutaciones presentes en solo una fracción muy pequeña de los modelos de ADN, proporcionó la base para la prueba PapGene.

Este estudio demuestra el valor de las pruebas de ADN endocervicouterino sensibles, pero hay muchos problemas que deben abordarse antes de conseguir un uso clínico óptimo. La prueba, incluso en su formato actual, parece ser prometedora para el cribado del cáncer de endometrio, ya que los datos en la figura 3 muestran que, incluso los cánceres de endometrio en el estadio más bajo podrían detectarse a través del análisis de ADN en el fluido de frotis de Papanicolaou a través de Safe-SeqS. Sin embargo, solo el 41 % de los cánceres de ovario se pudieron detectar en frotis de Papanicolaou incluso cuando se conocían las mutaciones en sus tumores. En ocho de los nueve frotis de Papanicolaou de pacientes con cáncer de ovario que contenían mutaciones detectables, las fracciones del alelo mutante fueron >0,1 % y, por lo tanto, se encontraban dentro del intervalo actualmente detectable mediante la prueba PapGene (figura 9, tabla S3). Mejoras adicionales en la tecnología podrían aumentar la sensibilidad técnica de la prueba PapGene y permitirle detectar más cánceres de ovario. Otras estrategias para aumentar esta sensibilidad incluyen maniobras físicas, tales como masajear la región aneja durante el examen pélvico o realizar la prueba PapGene en momentos específicos durante el ciclo menstrual. El desarrollo de un procedimiento mejorado de recogida también puede mejorar la sensibilidad. La muestra líquida actual está diseñada para la detección de cáncer de cuello uterino y, como tal, utiliza un cepillo que recoge células del ectocervix y solo penetra mínimamente en el canal endocervicouterino. Una pequeña cánula que puede introducirse en la cavidad endometrial similar al instrumento de biopsia endometrial cánula de Pipelle podría, en teoría, obtener una muestra más enriquecida de células provenientes del endometrio, la trompa de Falopio y el ovario (33).

La alta sensibilidad y la naturaleza cuantitativa de la prueba PapGene también abren la posibilidad de utilizarla para supervisar la respuesta a los agentes hormonales (por ejemplo, progestinas) utilizados para tratar a mujeres jóvenes con cánceres de endometrio de bajo riesgo. Algunas de estas mujeres optan por conservar la fertilidad, sometiéndose a terapia médica en lugar de histerectomía (34). La detección de cánceres de ovario presintomáticos, incluso si están avanzados, también podría ser beneficiosa. Aunque no es totalmente análogo, se ha demostrado que uno de los indicadores de pronóstico más importantes para el cáncer de ovario es la cantidad de enfermedad residual después de la citorreducción quirúrgica. Inicialmente, la citorreducción se consideró óptima si el tumor residual era inferior a 2 cm. Posteriormente, el umbral se redujo a 1 cm y los cirujanos ahora intentan extirpar cualquier tumor visible. Con cada mejora en la citorreducción quirúrgica, la supervivencia se ha prolongado (35). Es probable que un pequeño volumen de tumor sea más sensible a la quimioterapia citotóxica que la enfermedad grande y voluminosa típica de un carcinoma seroso sintomático de alta malignidad.

Un aspecto esencial del enfoque del cribado descrito en este contexto es que debe ser relativamente económico y fácil de incorporar en la exploración pélvica. La evaluación del ADN del VPH ya forma parte de la prueba de frotis de Papanicolaou de rutina, porque el análisis del VPH aumenta la sensibilidad de la prueba (36, 37). El componente de purificación de ADN de la prueba PapGene es idéntico al utilizado para el VPH, por lo que este componente es claramente factible. La preparación de ADN, la amplificación múltiple y el coste minorista del componente de secuenciación de la prueba PapGene también se pueden realizar, actualmente, a un coste comparable al de una prueba de rutina de VPH en los Estados Unidos. Cabe indicar que la mayor sensibilidad proporcionada por el componente Safe-SeqS de la prueba PapGene (véase el ejemplo 6) se puede implementar en cualquier instrumento de secuenciación masiva en paralelo, no solo en los fabricados por Illumina. Con la reducción en el coste de la secuenciación masiva en paralelo que se espera en el futuro, las pruebas PapGene deberían ser aún menos costosas.

Hay millones de pruebas de frotis de Papanicolaou que se realizan anualmente en los Estados Unidos ¿Se podrían realizar pruebas PapGene en un número tan grande de muestras? Los presentes inventores creen que sí, porque

todo el proceso de purificación y amplificación del ADN se puede automatizar, al igual que para las pruebas de VPH. Aunque ahora puede parecer poco realista que se realicen millones de estas sofisticadas pruebas basadas en secuencias cada año, indudablemente habría parecido poco realista realizar pruebas de frotis de Papanicolaou convencionales y generalizadas cuando Papanicolaou publicó su artículo original (31). Incluso hoy en día, cuando se analizan muchas muestras de citología de cuello uterino utilizando tecnologías automatizadas, un porcentaje significativo requiere la evaluación por parte de un citopatólogo experto. En contraste, el análisis de la prueba de PapGene se realiza completamente *in silico* y la lectura de la prueba es objetiva y cuantitativa.

En resumen, las pruebas PapGene tienen la capacidad de aumentar la utilidad del cribado por citología convencional a través de la detección inequívoca de carcinomas de endometrio y de ovario. Además del análisis de un número mucho mayor de pacientes con y sin diversos tipos de cánceres de endometrio, de ovario y de las trompas de Falopio, la siguiente etapa en esta línea de investigación es incluir genes alterados en el cáncer de cuello uterino, así como amplicones del VPH en el ensayo Safe-SeqS multiplexado (figura 10, tabla S5). Estas adiciones proporcionarán información que podría ser valiosa para el tratamiento de pacientes con estadios tempranos de neoplasia de cuello uterino, ya que la positividad para VPH por sí sola no es específica para la detección de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras, particularmente en mujeres jóvenes y sexualmente activas que frecuentemente albergan infecciones por VPH en ausencia de neoplasia.

Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos que se dan a conocer en el presente documento con fines de ilustración solamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1

Los presentes inventores pensaron que procedimientos moleculares más sofisticados podrían detectar la presencia de células cancerosas en muestras endocervicouterinas con sensibilidades y especificidades más altas que las posibles con los procedimientos convencionales. En particular, los presentes inventores plantean la hipótesis de que las mutaciones somáticas características de los cánceres de endometrio y de ovario se encontrarían en el ADN purificado a partir de frotis de Papanicolaou de rutina basados en líquidos (en lo sucesivo denominados "frotis de Papanicolaou"; figura 1). A diferencia de las células citológicamente atípicas, dichas mutaciones oncógenas de ADN son marcadores clonales específicos de neoplasia que deberían estar ausentes en las células no neoplásicas. Sin embargo, los presentes inventores no sabían si ese ADN estaría presente en las muestras endocervicouterinas, y no sabían si estarían presentes en una cantidad suficiente para detectarlos. Los experimentos descritos en este contexto se llevaron a cabo para poner a prueba la hipótesis de los presentes inventores.

Este estudio tenía cuatro componentes: I. Determinación de las mutaciones somáticas normalmente presentes en los cánceres de endometrio y de ovario; II. Identificación como mínimo de una mutación en los tumores de 46 pacientes con estos cánceres; III. Determinación de si las mutaciones identificadas en estos tumores también podrían detectarse en frotis de Papanicolaou de las mismas pacientes; y IV. Desarrollo de una tecnología que podría evaluar directamente las células de frotis de Papanicolaou para detectar mutaciones que comúnmente se encuentran en los cánceres de endometrio o de ovario.

EJEMPLO 2

Prevalencia de genes mutados somáticamente en cánceres de endometrio y de ovario.

Hay cinco subtipos histopatológicos principales de cáncer de ovario. El subtipo más prevalente es el carcinoma seroso de alta malignidad (60 % del total), seguido por el endometriode (15 %), el de células claras (10 %) y el seroso de baja malignidad (8 %) (tabla 1). Los estudios de genoma completo han identificado los genes más comúnmente mutados entre los subtipos de cáncer de ovario más prevalentes (tabla 2) (23-25).

Aún no se han notificado dichos estudios exhaustivos para los subtipos endometriode y mucinoso, que representan colectivamente el ~20 % de los casos de cáncer de ovario (tabla 1). Sin embargo, se han notificado genes comúnmente mutados en los subtipos endometriode y mucinoso (26). En conjunto, el gen más comúnmente mutado en los cánceres de ovario epiteliales fue el *TP53*, que mutó en el 69 % de estos cánceres (tabla 2). Otros genes altamente mutados incluían *ARID1A*, *BRAF*, *CTNNB1*, *KRAS*, *PIK3CA* y *PPP2R1A* (tabla 2).

Entre los cánceres de endometrio, el subtipo endometriode es, con mucho, el más común, representando el 85 % del total (tabla 1). Debido a que los cánceres de este subtipo son tan frecuentes y no se han analizado a nivel de todo el genoma, los presentes inventores los evaluaron mediante secuenciación de todo el exoma. El ADN purificado de 22 carcinomas endometrioides esporádicos, así como de tejidos no neoplásicos emparejados, se utilizó para generar 44 bibliotecas adecuadas para la secuenciación masiva en paralelo. Los aspectos clínicos de las pacientes y las características histopatológicas de los tumores se enumeran en la tabla S1. Si bien el examen de 22 cánceres no puede proporcionar un panorama genómico completo de un tipo de tumor, es adecuado para fines de diagnóstico, ya que solo requieren la identificación de los genes mutados más frecuentemente.

Entre las 44 bibliotecas, la cobertura promedio de cada base en la región seleccionada fue de 149,1 con el 88,4 % de las bases seleccionadas representadas, como mínimo, por diez lecturas. Utilizando criterios estrictos para la identificación de mutaciones somáticas (tal como se describe en Materiales y procedimientos), los datos de secuenciación delimitaron claramente los tumores en dos grupos: diez cánceres (denominados Grupo N, para no altamente mutados) albergaban <100 mutaciones somáticas por tumor (mediana 32, intervalo de 7 a 50), mientras que 12 cánceres (denominados Grupo H, para altamente mutados) albergaron >100 mutaciones somáticas por tumor (mediana 674, intervalo de 164 a 4,629) (figura 7, tabla S1).

El alto número de mutaciones en los tumores del Grupo H fue coherente con una deficiencia en la reparación del ADN. Ocho de los 12 tumores del Grupo H tenían inestabilidad de microsatélites (MSI-H, tabla S1), lo que respalda esta conjetura. Además, seis de los tumores del Grupo H contenían mutaciones somáticas en los genes de reparación de errores de emparejamiento *MSH2* o *MSH6*, mientras que ninguno de los cánceres del Grupo N contenía mutaciones en los genes de reparación de errores de emparejamiento. Se sabe que la deficiencia de reparación de errores de emparejamiento es común entre los cánceres de endometrio y estos tumores se presentan en el 19-71 % de las mujeres con mutaciones heredadas de genes de reparación de errores de emparejamiento (es decir, pacientes con cáncer colorrectal hereditario no polipósico) (27).

Se identificaron 12.795 mutaciones somáticas en los 22 cánceres. Los genes más comúnmente mutados incluyeron los genes de la ruta PIK3, *PTEN* y *PIK3CA* (28), los genes de la ruta APC, *APC* y *CTNNB1*, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos *FGFR2*, la proteína adaptadora *FBXW7* y los genes modificadores de la cromatina *ARID1A* y *MLL2* (tabla 2). Los genes en estas rutas estaban mutados tanto en los tumores del Grupo N como en los del H. Los resultados de los presentes inventores son coherentes con los estudios previos de cáncer de endometrio endometriode que habían evaluado pequeños números de genes, aunque no se ha apreciado que las mutaciones en *FBXW7*, *MLL2* y *APC* ocurran con la frecuencia con la que los encontraron los presentes inventores. También fue interesante que se encontraron pocas mutaciones de TP53 (5 %) en estos cánceres de endometrio (tabla 2), un descubrimiento que también es coherente con estudios anteriores.

Los carcinomas papilares serosos del endometrio representan el 10-15 % de los cánceres de endometrio, y se ha publicado un reciente estudio de secuenciación en todo el genoma de este subtipo de tumor (29). Las mutaciones más comunes en este subtipo se enumeran en la tabla 2. El subtipo menos común de los cánceres de endometrio son los carcinomas de células claras, que aparecen en <5 %. Los genes que se notificó que estaban mutados en estos cánceres se obtuvieron de la bibliografía (tabla 2).

EJEMPLO 3

Identificación de mutaciones en tejidos tumorales.

Se adquirieron tumores de 46 pacientes con cáncer de las que había frotis de Papanicolaou disponibles. Estas incluyeron 24 pacientes con cánceres de endometrio y 22 con cáncer de ovario; las características clínicas e histopatológicas se enumeran en la tabla S3.

Se identificaron mutaciones somáticas en los 46 tumores mediante la secuenciación de todo el exoma, tal como se ha descrito anteriormente o mediante la secuenciación dirigida de genes frecuentemente mutados en los subtipos más comunes de cáncer de ovario o de endometrio (tabla 2). El enriquecimiento de estos genes se consiguió utilizando un ensayo personalizado de captura en fase sólida compuesto por oligonucleótidos ("sondas de captura") complementarios a un panel de regiones génicas de interés. Para los oncogenes, solo sus exones comúnmente mutados fueron dianas, mientras que los presentes inventores establecieron como dianas todas las regiones codificantes de los genes supresores de tumores.

Las bibliotecas de secuenciación de ADN de Illumina se generaron a partir de tumores y sus tejidos no neoplásicos emparejados, a continuación, se capturaron con el ensayo descrito anteriormente. Después de la amplificación por PCR, se secuenciaron de cuatro a ocho bibliotecas de ADN capturadas por carril en un instrumento GA IIx de Illumina. En cada uno de los 46 casos, se identificó, como mínimo, una mutación somática (tabla S3) que se confirmó mediante un ensayo independiente, tal como se describe a continuación.

EJEMPLO 4

Identificación de mutaciones somáticas en frotis de Papanicolaou

En la técnica de frotis de Papanicolaou basado en líquido que se utiliza de forma rutinaria actualmente, el médico inserta un pequeño cepillo en el canal endocervicouterino durante una exploración pélvica y hace rotar el cepillo para que se desprenda y adhiera a las células o fragmentos de células fijadas débilmente. A continuación, el cepillo se coloca en un vial de solución fijadora (por ejemplo, ThinPrep). Parte del líquido del vial se utiliza para preparar un portaobjetos para el análisis citológico o para la purificación del ADN de VPH. En el estudio de los presentes inventores, se utilizó una alícuota del ADN purificado a partir del líquido para evaluar la presencia de ADN de los cánceres de las 46 pacientes descritas anteriormente. Los estudios preliminares mostraron que las células o los

fragmentos celulares fijados en el líquido, sedimentados por centrifugación a 1.000 g durante cinco minutos, contenían >95 % del ADN total en el vial. Por lo tanto, se purificó el ADN de los sedimentos celulares cuando la cantidad de líquido disponible era superior a 3 ml (tal como ocurre con algunos kits de frotis de Papanicolaou basado en líquido) y, por conveniencia, se purificó el ADN tanto del líquido como de las células cuando había cantidades más pequeñas de líquido en el kit. En todos los casos, el ADN purificado tenía un peso molecular relativamente alto (95 % >5 kb). La cantidad promedio de ADN recuperado de los 46 frotis de Papanicolaou fue de $49,3 \pm 74,4$ ng/ml (tabla S3).

Los presentes inventores previeron que, si estuviera presente en lo más mínimo, la cantidad de ADN derivado de las células neoplásicas en el líquido del frotis de Papanicolaou sería relativamente pequeña en comparación con el ADN derivado de células normales cepilladas del canal endocervicouterino. Esto requería la utilización de una técnica analítica que pudiera identificar de manera fiable una población rara de alelos mutantes entre un gran exceso de alelos de tipo silvestre. Se diseñó una modificación de uno de los procedimientos de Safe-SeqS (Safe-Sequencing System) descritos en (30) para este fin (figura 2).

En resumen, se realizó un número limitado de ciclos de PCR con un conjunto de cebadores específicos de genes. Uno de los cebadores contenía 14 bases N degeneradas (la misma probabilidad de ser una A, C, G o T) ubicadas 5' respecto a su secuencia específica del gen, y ambos cebadores contenían secuencias que permitían la amplificación universal en la siguiente etapa. Las 14 N formaron identificadores únicos (UID) para cada molécula modelo original. Los productos de PCR posteriores generados con cebadores universales se purificaron y se secuenciaron en un instrumento MiSeq de Illumina. Si existía previamente una mutación en una molécula modelo, esa mutación debería estar presente en cada molécula hija que contuviera ese UID, y dichas mutaciones se llaman "supermutantes" (30). Las mutaciones que no se producen en los modelos originales, tales como las que se producen durante las etapas de amplificación o a través de errores en la lectura automática de nucleótidos, no deben dar lugar a supermutantes. El enfoque de Safe-SeqS utilizado en el presente documento es capaz de detectar 1 modelo mutante entre 5.000 y 1.000.000 modelos de tipo silvestre, dependiendo del amplicón y la posición dentro del amplicón que se consulta (30).

Los presentes inventores diseñaron cebadores de Safe-SeqS (tabla S4) para detectar, como mínimo, una mutación de cada una de las 46 pacientes descritas en la tabla S3. En los 24 frotis de Papanicolaou de pacientes con cánceres de endometrio, la mutación presente en el tumor se identificó en todos los casos (100 %). La fracción mediana de alelos mutantes fue del 2,7 %, y osciló entre el 0,01 % y el 78 % (figura 3 y tabla S3). Las amplificaciones de ADN de tejidos no neoplásicos se utilizaron como controles negativos en estos experimentos para definir los límites de detección de cada mutación consultada. En todos los casos, la fracción de alelos mutantes fue significativamente diferente de los niveles de mutación de fondo determinados a partir de los controles negativos ($P < 0,001$, prueba binomial). No hubo una correlación obvia entre la fracción de alelos mutantes y el subtipo histopatológico o el estadio del cáncer (figura 3 y tabla S3).

En dos casos de cáncer de endometrio, se evaluaron dos mutaciones descubiertas en el ADN tumoral en los frotis de Papanicolaou (tabla S3). En ambos casos, las mutaciones se identificaron en ADN del frotis de Papanicolaou (tabla S3). Además, las relaciones entre las fracciones de alelos mutantes de las dos mutaciones en los frotis de Papanicolaou se correlacionaron con las de las muestras de tumores correspondientes. Por ejemplo, en el frotis de Papanicolaou del caso PAP 083, las fracciones del alelo mutante para las mutaciones *CTNNB1* y *PIK3CA* fueron el 0,143 % y el 0,064 %, respectivamente, una relación de 2,2 (= del 0,14 % al 0,064 %). En el tumor primario de PAP 083, la relación correspondiente fue de 2,0 (del 79,5 % al 39,5 %).

Un análisis similar del ADN del frotis de Papanicolaou de pacientes con cáncer de ovario reveló mutaciones detectables en nueve de las 22 pacientes (41 %). La fracción de alelos mutantes fue menor que en los cánceres de endometrio (mediana del 0,49 %, intervalo del 0,021 % al 5,9 %; véase figura 3 y tabla S3). Todos menos uno de los casos con mutaciones detectables fueron tumores epiteliales; la excepción fue un disgerminoma, un tumor maligno de células germinales del ovario (tabla S3). Al igual que con los cánceres de endometrio, no hubo una correlación estadísticamente significativa entre la fracción de alelos mutantes y los criterios histopatológicos. Sin embargo, la mayoría de los cánceres de ovario se detectan solo en un estadio avanzado, y esto se reflejó en las pacientes disponibles en nuestra cohorte.

EJEMPLO 5

Una prueba genética para fines de cribado

Los resultados descritos anteriormente documentan que las moléculas de ADN mutantes de la mayoría de los cánceres de endometrio y algunos cánceres de ovario se pueden encontrar en frotis de Papanicolaou recogidos de manera rutinaria. Sin embargo, en los 46 casos representados en la figura 3, se sabía que se producía una mutación específica en el tumor, y posteriormente se diseñó un ensayo para determinar si esa mutación también estaba presente en los frotis de Papanicolaou correspondientes. En una configuración de cribado, obviamente no habría un tumor conocido antes de la prueba. Por lo tanto, los presentes inventores diseñaron una prueba prototipo basada en Safe-SeqS que podría utilizarse en una configuración de cribado (figura 2).

Este enfoque multiplexado incluyó 50 pares de cebadores que amplificaron segmentos de 241 a 296 pb que contenían regiones de ADN frecuentemente mutadas. Las regiones a amplificar se seleccionaron de los resultados descritos en la Sección I e incluyeron exones de *APC*, *AKT1*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *FBXW7*, *KRAS*, *PIK3CA*, *PPP2R1A*, *PTEN* y *TP53*. En los experimentos de control, 46 de los 50 amplicones mostraron proporcionar información sobre un mínimo de 2.500 modelos; el número de modelos secuenciados se puede determinar directamente a partir de la secuenciación basada en SafeSeqS (figura 2). Dada la precisión de SafeSeqS, este número fue adecuado para detectar cómodamente las mutaciones existentes en >0,1 % de las moléculas modelo (30). Se predijo que las regiones cubiertas por estos 46 amplicones (tabla S5), que abarcan 10.257 pb, podrían detectar, como mínimo, una mutación en >90 % de los cánceres de endometrio o de ovario.

Esta prueba se aplicó a los frotis de Papanicolaou de 14 casos, doce de endometrio y dos de ovario, así como a 14 frotis de Papanicolaou obtenidos de mujeres normales. Los 14 casos de cáncer se seleccionaron arbitrariamente de aquellos que tenían fracciones de alelos mutantes >0,1 % (tabla S3) y, por lo tanto, por encima del límite de detección del ensayo multiplexado. En los 14 frotis de Papanicolaou de mujeres con cáncer, se identificó (figura 4 y tabla S6) la mutación que se esperaba que estuviera presente (tabla S3). La fracción de alelos mutantes en la prueba multiplexada fue similar a la observada en el análisis original de las mismas muestras utilizando solo un par de cebadores de Safe-SeqS por amplicón (tabla S3 y tabla S6). Es importante destacar que no se detectaron mutaciones en los 14 frotis de Papanicolaou de mujeres sin cáncer (figura 4; véase Materiales y procedimientos).

EJEMPLO 6

Materiales y procedimientos

Muestras de paciente

Todas las muestras para este estudio se obtuvieron utilizando protocolos aprobados por las Juntas de Revisión Institucional de The Johns Hopkins Medical Institutions (Baltimore, MD), Memorial Sloan Kettering Cancer Center (New York, NY), Universidad de Sao Paulo (Sao Paulo, Brasil) e ILSbio, LLC (Chestertown, MD). Se recogieron datos demográficos, clínicos y patológicos de estadificación para cada caso. Toda la histopatología fue revisada a nivel central por patólogos en posesión de un certificado de especialidad. La estadificación se basó en los criterios de FIGO de 2009 (38).

Las muestras de tejido recién congelado de neoplasias del ovario y endometrio resecadas quirúrgicamente se analizaron por sección congelada para evaluar la celularidad neoplásica por un patólogo en posesión de un certificado de especialidad. Se utilizaron secciones congeladas en serie para guiar el recorte de los bloques de tejido congelado incluidos en compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) para enriquecer la fracción de células neoplásicas para la extracción de ADN.

Las muestras de tejido incrustadas en parafina (FFPE) fijadas con formalina fueron evaluadas por un patólogo en posesión de un certificado de especialidad (ProPath LLC, Dallas, TX) para determinar la celularidad del tumor y para demarcar el área de alta celularidad del tumor. Se macrodisecionó tejido tumoral de secciones en serie de 10 micras en portaobjetos del bloque tumoral original con una cuchilla de afeitar para enriquecer la fracción de células neoplásicas para la extracción de ADN.

La fuente de ADN normal fue sangre completa compatible o tejido adyacente normal no neoplásico.

Los frotis de Papanicolaou a base de líquido se recogieron utilizando cepillos cervicouterinos y medio de transporte del dispositivo de recogida de ADN Digene HC2 (Qiagen) o del sistema ThinPrep 2000 (Hologic) y se almacenaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

A menos que se indique lo contrario, todos los valores relacionados con la paciente se notifican como media \pm 1 desviación estándar.

Extracción de ADN

Se purificó ADN a partir de tejido tumoral y normal, así como frotis de Papanicolaou a base de líquido utilizando un kit AllPrep (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se purificó a partir de tejido tumoral añadiendo 3 ml de tampón RLTM (Qiagen) y, a continuación, uniéndolo a una columna de ADN AllPrep (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN se purificó a partir de líquidos de frotis de Papanicolaou añadiendo cinco volúmenes de tampón RLTM cuando la cantidad de líquido era inferior a 3 ml. Cuando la cantidad de líquido era >3 ml, las células y los fragmentos celulares se sedimentaron a 1.000 x g durante cinco minutos y los sedimentos se disolvieron en 3 ml de tampón RLTM. El ADN se cuantificó en todos los casos con qPCR, utilizando los cebadores y las condiciones descritas anteriormente (39).

Pruebas de inestabilidad de microsatélites

La inestabilidad de microsatélites se detectó utilizando el sistema de análisis de MSI (Promega), que contenía cinco repeticiones de mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y MONO-27) y dos loci de repetición de pentanucleótidos, según las instrucciones del fabricante. Después de la amplificación, los productos de PCR fluorescentes se dimensionaron en un instrumento de electroforesis capilar Applied Biosystems 3130 (Invitrogen). Las muestras de tumores se designaron de la siguiente manera: MSI alta si dos o más mononucleótidos variaban en longitud en comparación con el ADN de la línea germinal; MSI baja si solo variaba un locus; y microsatélite estable (MSS) si no hubo variación en comparación con la línea germinal. Los loci de pentanucleótidos confirmaron la identidad en todos los casos.

Preparación de bibliotecas de ADN de Illumina y captura para secuenciación exómica.

La preparación de las bibliotecas de ADN genómico de Illumina para capturas de ADN exómicas y dirigidas se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, se utilizaron 1-3 µg de ADN genómico para la preparación de la biblioteca utilizando el kit de preparación de muestras TruSeqDNA (Illumina). El ADN se cizalló acústicamente (Covaris) a un tamaño objetivo de ~200 pb. Los fragmentos se repararon en el extremo posteriormente para convertir salientes en extremos romos. A continuación se añadió un solo nucleótido "A" a los extremos 3' de los fragmentos romos para evitar que se autoligarán más tarde; una "T" correspondiente en el extremo 3' de las moléculas adaptadoras proporcionó el saliente complementario. Después de la unión a los adaptadores, la biblioteca se amplificó con 8-14 ciclos de PCR para garantizar rendimientos de 0,5 y 4 µg para las capturas de genes exómicos y dirigidos, respectivamente.

La captura exómica se realizó con el kit SureSelect Human Exome V 4.0 (Agilent) de acuerdo con el protocolo del fabricante, con la adición de bloques específicos de índice TruSeq en la mezcla de hibridación (AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-XXXXXX-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTGT (SEQ ID NO: 1), en la que los seis pares de bases "XXXXXX" denotan uno de los 12 índices específicos de la muestra).

Enriquecimiento génico dirigido

El enriquecimiento génico dirigido se realizó mediante modificaciones de procedimientos descritos anteriormente (40, 41). En resumen, las regiones diana de los oncogenes seleccionados y los genes supresores de tumores fueron sintetizadas como sondas de oligonucleótidos por Agilent Technologies. Las sondas de 36 bases se diseñaron para capturar tanto la cadena positiva como la negativa del ADN y tenían un solapamiento de 33 bases. Los oligonucleótidos se escindieron del chip incubando con 3 ml de hidróxido de amonio al 35 % a temperatura ambiente durante cinco horas. La solución se transfirió a dos tubos de 2 ml, se secó al vacío y se redisolvió en 400 µl de agua libre de ribonucleasa (ARNasa) y desoxirribonucleasa (ADNasa). Se utilizaron cinco microlitros de la solución para la amplificación por PCR con cebadores complementarios a la secuencia de 12 bases común a todas las sondas: 5'-TGATCCCGCGACGA*C-3' (SEQ ID NO: 2) y 5'-GACCGCGACTCCAG*C-3' (SEQ ID NO: 3), con * indicando un enlace de fosforotioato. Los productos de PCR se purificaron con una columna de purificación MinElute (Qiagen), se repararon en el extremo con el kit de reparación End-IT DNA End-Repair Kit (Epicentre) y a continuación se purificaron con una columna de purificación MinElute (Qiagen). Los productos de la PCR se ligaron para formar concatámeros tal como se ha descrito (40).

La principal diferencia entre el protocolo descrito en (40, 41) y el utilizado en el presente estudio implicó la amplificación de los productos de PCR ligados y el procedimiento de captura en fase sólida. Las modificaciones fueron las siguientes: se amplificaron 50 ng de producto de PCR ligado utilizando el kit REPLI-g Midi (Qiagen) con la adición de 2,5 nmol de Biotin-dUTP (Roche) en una reacción de 27,5 µl. La reacción se incubó a 30 °C durante 16 horas, la polimerasa se inactivó a 65 °C durante 3 minutos. Las sondas amplificadas se purificaron con columnas de purificación por PCR QiaQuick (Qiagen). Para la captura, se incubaron 4-5 µg de ADN de biblioteca con 1 µg de las sondas preparadas en una mezcla de hibridación tal como se ha descrito anteriormente (40). Las sondas biotiniladas y las secuencias de la biblioteca capturadas se purificaron posteriormente utilizando 500 µg de Dynabeads® MyOne Streptavidin (Invitrogen). Después del lavado según las recomendaciones del fabricante, las secuencias capturadas se eluyeron con NaOH 0,1 M y a continuación se neutralizaron con Tris-HCl 1 M (pH 7.5). El ADN neutralizado se desalificó y se concentró utilizando una columna QIAquick MinElute (Qiagen) en 20 µl. El eluato se amplificó en una reacción de Phusion Hot Start II (Thermo Scientific) de 100 µl que contenía tampón 1X Phusion HF, dNTP 0,25 mM, 0,5 µM de cada uno de los cebadores TruSeq directos e inversos, y 2 U de polimerasa con las siguientes condiciones de ciclado: 98 °C durante 30 segundos; 14 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos; y 72 °C durante 5 minutos. El grupo amplificado que contenía secuencias diana enriquecidas se purificó utilizando un sistema Agencourt AMPure XP (Beckman) y se cuantificó utilizando un bioanalizador 2100 (Agilent).

Secuenciación de la nueva generación e identificación de mutaciones somáticas

Después de la captura de las secuencias seleccionadas, la secuenciación de extremos emparejados con un

anizador de genoma Illumina GA IIx proporcionó 2 x 75 lecturas básicas de cada fragmento. Las marcas de secuencia que pasaron el filtrado se alinearon con la secuencia de referencia del genoma humano (hg18) y se realizó el posterior análisis de lectura automática de nucleótidos de una variante utilizando el algoritmo ELANDv2 en el software CASAVA 1.6 (Illumina). Se eliminaron los polimorfismos conocidos registrados en la base de datos dbSNP del análisis. La identificación de mutaciones de alta confianza se realizó tal como se la descrito anteriormente (24).

Evaluación de mutaciones de baja frecuencia.

Diseño de cebadores. Los presentes inventores intentaron diseñar pares de cebadores para detectar mutaciones en los 46 cánceres descritos en el texto. Los cebadores se diseñaron tal como se ha descrito (30), utilizando Primer3 (42). El sesenta por ciento de los cebadores amplificó los fragmentos esperados; en el otro 40 %, se tuvo que diseñar un segundo o tercer conjunto de cebadores para reducir los dímeros de cebadores o la amplificación no específica.

Preparación de bibliotecas de secuenciación. Los modelos se amplificaron, tal como se ha descrito anteriormente (30), con modificaciones que se describirán en su totalidad en otra parte. En resumen, cada cadena de cada molécula modelo se codificó con un identificador único (UID) de 14 bases, compuesto por N bases degeneradas (igual probabilidad de ser una A, C, G o T), utilizando de dos a cuatro ciclos de PCR específica del amplicón (ciclos de PCR de asignación de UID, véase la figura 2). Aunque los cebadores específicos de gen tanto directos como inversos contenían secuencias de etiqueta universales en sus extremos 5', que proporcionan los sitios de unión del cebador para la amplificación de segunda ronda, solo el cebador directo contenía el UID, situado entre la etiqueta universal 5' y las secuencias específicas de genes 3' (se incluyeron cuatro N en el cebador inverso para facilitar la secuenciación realizada en bibliotecas de extremos emparejados) (tabla S4). Los ciclos de PCR de asignación de UID incluyeron Phusion Hot Start II (Thermo Scientific) en una reacción de 50 µl que contenía tampón 1X Phusion HF, dNTP 0,25 mM, 0,5 µM de cada uno de los cebadores directos (que contenían 14 N) e inversos, y 2 U de polimerasa. La transferencia de los cebadores que contienen UID residuales a la amplificación de segunda ronda, que puede complicar la cuantificación del modelo (30), se minimizó a través de digestión con exonucleasa a 37 °C para degradar los cebadores no incorporados y posterior purificación con perlas de AMPure XP (Beckman) y elución en 10 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

Las modelos eluidos se amplificaron en una PCR de segunda ronda utilizando cebadores que contenían las secuencias de injerto necesarias para la hibridación con la celda de flujo GA IIx de Illumina en sus extremos 5' (figura 2) y dos fosforotioatos 3' terminales para protegerlos de la actividad exonucleasa residual (30). El cebador de amplificación inverso contenía adicionalmente una secuencia índice entre el injerto 5' y las secuencias de etiqueta universales 3' para permitir que los productos de PCR de múltiples individuos se analizarán simultáneamente en el mismo compartimento de celdas de flujo del secuenciador (30). Las reacciones de amplificación de segunda ronda contenían tampón 1X Phusion HF, dNTP 0,25 mM, 0,5 µM de cada uno de los cebadores directos e inversos, y 2 U de polimerasa en un total de 50 µl. Después de una etapa de activación por calor inicial a 98 °C durante 2 minutos, se realizaron veintitrés ciclos de PCR utilizando las siguientes condiciones de ciclado: 98 °C durante 10 segundos, 65 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 15 segundos. El ensayo multiplexado se realizó de manera similar utilizando seis amplificaciones independientes por muestra con los cebadores descritos en la tabla S5. Los productos de PCR se purificaron utilizando perlas AMPure XP y se utilizaron directamente para secuenciar en los instrumentos MiSeq o GA IIx de Illumina, con resultados equivalentes.

Análisis de datos. Las lecturas de secuencia de alta calidad se analizaron tal como se ha descrito anteriormente (30). En resumen, las lecturas en las que cada una de las 14 bases que componen el UID (que representa una cadena modelo original; véase la figura 2) tenían una puntuación de calidad ≥ 15 se agruparon por su UID. Solo los UID soportados por más de una lectura se conservaron para un análisis adicional. La parte específica de modelo de las lecturas que contenían la secuencia de un cebador de amplificación esperado se emparejó a un conjunto de secuencias de referencia utilizando un script personalizado (disponible de los autores bajo pedido). Las mutaciones artificiales (introducidas durante la preparación de la muestra y/o las etapas de secuenciación) se eliminaron requiriendo que >50 % de las lecturas que compartían el mismo UID contuvieran la mutación idéntica (un "supermutante", véase la figura 2). Para los 46 ensayos que consultaron un solo amplicón, se requirió que la fracción de alelos mutantes fuera significativamente diferente de los niveles de mutación de fondo determinados a partir de un control negativo ($P < 0,001$, prueba binomial). Como las mutaciones no se conocen a priori en un entorno de cribado, se utilizó una métrica más escéptica para detectar mutaciones en el ensayo multiplexado. Se definió un umbral de frecuencia de supermutante para cada muestra como igual a la frecuencia media de todos los supermutantes más seis desviaciones estándar de la media. Solo los supermutantes que superaron este umbral se designaron mutaciones y se notificaron en la figura 4 y la tabla S6.

Referencias

1. M. Arbyn, A. Anttila, J. Jordan, G. Ronco, U. Schenck, N. Segnan, H. Wiener, A. Herbert, L. Von Karsa, European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second edition—summary document. *Ann Oncol* 21,

- 448-458 (2010).
2. R. M. DeMay, *Practical principles of cytopathology*. (ASCP Press, Chicago, 2010), pp. xi, 402 p.
 3. F. Bray, J. S. Ren, E. Masuyer, J. Ferlay, Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, (2012).
 - 5 4. J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide (IARC Cancer- Base No. 10, Lyon, France, 2010).
 5. S. B. Sams, H. S. Currens, S. S. Raab, Liquidbased Papanicolaou tests in endometrial carcinoma diagnosis. Performance, error root cause analysis, and quality improvement. *Am J Clin Pathol* 137, 248-254 (2012).
 6. P. Smith, O. Bakos, G. Heimer, U. Ulmsten, Transvaginal ultrasound for identifying endometrial abnormality. *Acta Obstet Gynecol Scand* 70, 591-594 (1991).
 - 10 7. H. Mitchell, G. Giles, G. Medley, Accuracy and survival benefit of cytological prediction of endometrial carcinoma on routine cervical smears. *Int J Gynecol Pathol* 12, 34-40 (1993).
 8. K. J. Carlson, S. J. Skates, D. E. Singer, Screening for ovarian cancer. *Ann Intern Med* 121, 124-132 (1994).
 9. H. Meden, A. Fattahi-Meibodi, CA 125 in benign gynecological conditions. *Int J Biol Markers* 13, 231-237 (1998).
 - 15 10. S. S. Buys, E. Partridge, A. Black, C. C. Johnson, L. Lamerato, C. Isaacs, D. J. Reding, R. T. Greenlee, L. A. Yokochi, B. Kessel, E. D. Crawford, T. R. Church, G. L. Andriole, J. L. Weissfeld, M. N. Fouad, D. Chia, B. O'Brien, L. R. Ragard, J. D. Clapp, J. M. Rathmell, T. L. Riley, P. Hartge, P. F. Pinsky, C. S. Zhu, G. Izmirlian, B. S. Kramer, A. B. Miller, J. L. Xu, P. C. Prorok, J. K. Gohagan, C. D. Berg, Effect of 17 18 screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA* 305, 2295-2303 (2011).
 - 20 11. ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists. Number 60, March 2005. Pregestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 105, 675-685 (2005).
 12. E. Partridge, A. R. Kreimer, R. T. Greenlee, C. Williams, J. L. Xu, T. R. Church, B. Kessel, C. C. Johnson, J. L. Weissfeld, C. Isaacs, G. L. Andriole, S. Ogden, L. R. Ragard, S. S. Buys, Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial. *Obstet Gynecol* 113, 775-782 (2009).
 - 25 13. American Cancer Society. Detailed guide: ovarian cancer - can ovarian cancer be found early? (Available at <http://www.cancer.org/Cancer/OvarianCancer/ DetailedGuide/ovarian-cancer-detection>).
 14. Screening for ovarian cancer: recommendation statement. U.S. Preventive Services Task Force. *Am Fam Physician* 71, 759-762 (2005).
 - 30 15. ACOG Committee Opinion: number 280, December 2002. The role of the generalist obstetriciangynecologist in the early detection of ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 100, 1413-1416 (2002).
 16. National Comprehensive Cancer Network Practice Guidelines in Oncology: ovarian cancer and genetic screening. (Available at http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/genetics_screening.pdf).
 - 35 17. N. M. Lindor, G. M. Petersen, D. W. Hadley, A. Y. Kinney, S. Miesfeldt, K. H. Lu, P. Lynch, W. Burke, N. Press, Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review. *JAMA* 296, 1507-1517 (2006).
 18. J. P. Marques, L. B. Costa, A. P. Pinto, A. F. Lima, M. E. Duarte, A. P. Barbosa, P. L. Medeiros, Atypical glandular cells and cervical cancer: systematic review. *Rev Assoc Med Bras* 57, 234-238 (2011).
 - 40 19. R. P. Insinga, A. G. Glass, B. B. Rush, Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 191, 105-113 (2004).
 20. K. E. Sharpless, P. F. Schnatz, S. Mandavilli, J. F. Greene, J. I. Sorosky, Dysplasia associated with atypical glandular cells on cervical cytology. *Obstet Gynecol* 105, 494-500 (2005).
 21. C. P. DeSimone, M. E. Day, M. M. Tovar, C. S. Dietrich, 3rd, M. L. Eastham, S. C. Modesitt, Rate of pathology from atypical glandular cell Pap tests classified by the Bethesda 2001 nomenclature. *Obstet Gynecol* 107, 1285-1291 (2006).
 - 45 22. C. S. Geier, M. Wilson, W. Creasman, Clinical evaluation of atypical glandular cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 184, 64-69 (2001).
 23. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474, 609-615 (2011).
 - 50 24. S. Jones, T. L. Wang, M. Shih Ie, T. L. Mao, K. Nakayama, R. Roden, R. Glas, D. Slamon, L. A. Diaz, Jr., B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, N. Papadopoulos, Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 330, 228-231 (2010).
 25. S. Jones, T. L. Wang, R. J. Kurman, K. Nakayama, V. E. Velculescu, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, N. Papadopoulos, M. Shih Ie, Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *J Pathol* 226, 413-420 (2012).
 - 55 26. S. A. Forbes, N. Bindal, S. Bamford, C. Cole, C. Y. Kok, D. Beare, M. Jia, R. Shepherd, K. Leung, A. Menzies, J. W. Teague, P. J. Campbell, M. R. Stratton, P. A. Futreal, COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 39, D945-950 (2011).
 27. E. Barrow, L. Robinson, W. Alduaij, A. Shenton, T. Clancy, F. Laloo, J. Hill, D. G. Evans, Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet* 75, 141-149 (2009).
 - 60 28. K. Oda, D. Stokoe, Y. Taketani, F. McCormick, High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 65, 10669-10673 (2005).
 29. E. Kuhn, R. C. Wu, B. Guan, G. Wu, J. Zhang, Y. Wang, L. Song, X. Yuan, L. Wei, R. B. Roden, K. T. Kuo, K. Nakayama, B. Clarke, P. Shaw, N. Olvera, R. J. Kurman, D. A. Levine, T. L. Wang, I. M. Shih, Identification of Molecular Pathway Aberrations in Uterine Serous Carcinoma by Genome-wide Analyses. *J Natl Cancer Inst*, (2012).
 - 65 30. I. Kinde, J. Wu, N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, Detection and quantification of rare mutations with

- massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9530-9535 (2011).
31. H. F. Traut, G. N. Papanicolaou, *Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis*. *Cal West Med* 59, 121-122 (1943).
32. B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. *Nat Med* 10, 789-799 (2004).
- 5 33. J. M. Cooper, M. L. Erickson, *Endometrial sampling techniques in the diagnosis of abnormal uterine bleeding*. *Obstet Gynecol Clin North Am* 27, 235-244 (2000).
34. C. C. Gunderson, A. N. Fader, K. A. Carson, R. E. Bristow, *Oncologic and reproductive outcomes with progestin therapy in women with endometrial hyperplasia and grade 1 adenocarcinoma: a systematic review*. *Gynecol Oncol* 125, 477-482 (2012).
- 10 35. R. E. Bristow, R. S. Tomacruz, D. K. Armstrong, E. L. Trimble, F. J. Montz, *Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma- 19 20 ma during the platinum era: a meta-analysis*. *J Clin Oncol* 20, 1248-1259 (2002).
36. M. H. Mayrand, E. Duarte-Franco, I. Rodrigues, S. D. Walter, J. Hanley, A. Ferenczy, S. Ratnam, F. Coutlee, E. L. Franco, *Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer*. *N Engl J Med* 357, 1579-1588 (2007).
- 15 37. P. Naucler, W. Ryd, S. Tornberg, A. Strand, G. Wadell, K. Elfgrén, T. Radberg, B. Strander, B. Johansson, O. Forslund, B. G. Hansson, E. Rylander, J. Dillner, *Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer*. *N Engl J Med* 357, 1589-1597 (2007).
38. S. Pecorelli, *Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium*. *Int J Gynaecol Obstet* 20 105, 103-104 (2009).
39. C. Rago, D. L. Huso, F. Diehl, B. Karim, G. Liu, N. Papadopoulos, Y. Samuels, V. E. Velculescu, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, L. A. Diaz, Jr., *Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA*. *Cancer Res* 67, 9364-9370 (2007).
40. J. Wu, H. Matthaei, A. Maitra, M. Dal Molin, L. D. Wood, J. R. Eshleman, M. Goggins, M. I. Canto, R. D. Schulick, B. H. Edil, C. L. Wolfgang, A. P. Klein, L. A. Diaz, Jr., P. J. Allen, C. M. Schmidt, K. W. Kinzler, N. Papadopoulos, R. H. Hruban, B. Vogelstein, *Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development*. *Sci Transl Med* 3, 92ra66 (2011).
- 25 41. J. He, J. Wu, Y. Jiao, N. Wagner-Johnston, R. F. Ambinder, L. A. Diaz, Jr., K. W. Kinzler, B. Vogelstein, N. Papadopoulos, *IgH gene rearrangements as plasma biomarkers in Non-Hodgkin's lymphoma patients*. *Oncotarget* 2, 178-185 (2011).
- 30 42. S. Rozen, H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. *Methods Mol Biol* 132, 365-386 (2000).
43. N. Howlader, A.M. Noone, M. Krapcho, N. Neyman, R. Aminou, S. F. Altekruse, C.L. Kosary, J. Ruhl, Z. Tatalovich, H. Cho, A. Mariotto, M. P. Eisner, D. R. Lewis, H. S. Chen, E. J. Feuer, K. A. Cronin, *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009* (National Cancer Institute. Bethesda, MD, 2012).
- 35 44. A. Malpica, M. T. Deavers, K. Lu, D. C. Bodurka, E. N. Atkinson, D. M. Gershenson, E. G. Silva, *Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system*. *Am J Surg Pathol* 28, 496-504 (2004).
45. L.A.G. Ries, J.L. Young, G.E. Keel, M.P. Eisner, Y.D. Lin, M-J. Horner, *SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: US SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics* (NIH Pub. No. 07-6215.
- 40 46. C. A. Hamilton, M. K. Cheung, K. Osann, L. Chen, N. N. Teng, T. A. Longacre, M. A. Powell, M. R. Hendrickson, D. S. Kapp, J. K. Chan, *Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers*. *Br J Cancer* 94, 642-646 (2006).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento que comprende:
 5 poner a prueba una muestra de un sujeto humano para un cambio genético o epigenético en uno o más ácidos nucleicos mutados en una neoplasia o un cáncer de ovario, en el que la etapa de prueba se realiza aumentando la sensibilidad de instrumentos de secuenciación masiva en paralelo con una técnica de reducción de errores que incluye:
- 10 (i) asignación de un identificador único (UID) a cada molécula modelo para formar moléculas modelo con código de barras; y
 (ii) secuenciación redundante de las moléculas modelo con código de barras, y
- en la que la muestra:
- 15 (a) comprende células o fragmentos de ovario, y
 (b) es una muestra endocervical.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que:
- 20 (1) el cambio es una mutación de sustitución;
 (2) el cambio es una reordenación;
 (3) el cambio es una delección; o
 (4) el cambio es una pérdida o ganancia de metilación.
- 25 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el cambio se determina con respecto a la mayor parte de los genes o ARNm presentes en la muestra.
4. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el cáncer de ovario se elige entre un tumor de ovario seroso de alta malignidad, endometriode, células claras, seroso de baja malignidad o mucinoso.
- 30 5. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende analizar la muestra en busca de una o más mutaciones en uno o más ácidos nucleicos mutados en la neoplasia o el cáncer de ovario, dichos ácidos nucleicos comprenden un gen seleccionado del grupo que consiste en *CTNNB1*, *EGFR*, *PI3KCA*, *PTEN*, *TP53*, *BRAF*, *KRAS*, *AKT1*, *NRAS*, *PPP2R1A*, *APC*, *FBXW7*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *MLL2*, *RFF43* y *FGFR2*.
- 35 6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que:
- (1) la etapa de prueba se realiza, como mínimo, en 3 de dichos ácido nucleicos;
 (2) la etapa de prueba se realiza, como mínimo, en 5 de dichos ácido nucleicos;
 40 (3) la etapa de prueba se realiza, como mínimo, en 7 de dichos ácido nucleicos;
 (4) la etapa de prueba se realiza, como mínimo, en 9 de dichos ácido nucleicos;
 (5) la etapa de prueba se realiza, como mínimo, en 11 de dichos ácido nucleicos; o
 (6) la etapa de prueba se realiza, como mínimo, en 12 de dichos ácido nucleicos.
- 45 7. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que:
- (1) la etapa de prueba se realiza en un ensayo múltiplex.
 (2) la etapa de prueba se realiza aumentando la sensibilidad de los instrumentos de secuenciación masiva en paralelo con una técnica de reducción de errores que permite la detección de alelos mutantes raros en un
 50 intervalo de 1 modelo mutante entre 5.000 y 1.000.000 modelos de tipo silvestre; o
 (3) la etapa de prueba se realiza incrementando la sensibilidad de los instrumentos de secuencia masiva en paralelo con una técnica de reducción de errores que incluye la amplificación de cada molécula modelo marcada de forma única para crear familias de UID.
- 55 8. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la etapa de prueba se repite a lo largo del tiempo.
9. Procedimiento, según la reivindicación 1, que utiliza un kit que comprende, como mínimo, 10 sondas, o como mínimo 10 pares de cebadores,
- 60 en el que cada sonda en el kit comprende, como mínimo, 15 nt de secuencia complementaria a uno del panel de genes, en el que el panel es acumulativamente complementario a, como mínimo, 10 genes diferentes, en el que el panel se selecciona del grupo que comprende *CTNNB1*, *EGFR*, *PI3KCA*, *PTEN*, *TP53*, *BRAF*, *KRAS*, *AKT1*, *NRAS*, *PPP2R1A*, *APC*, *FBXW7*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *MLL2*, *RFF43* y *FGFR2*, en el que las sondas están biotiniladas o unidas a perlas; o,
- 65 en el que cada cebador en el kit comprende, como mínimo, 15 nt de secuencia complementaria a uno del panel de genes, en el que el panel es acumulativamente complementario a, como mínimo, 10 genes diferentes, en el que el

panel se selecciona del grupo que comprende *CTNNB1*, *EGFR*, *PI3KCA*, *PTEN*, *TP53*, *BRAF*, *KRAS*, *AKT1*, *NRAS*, *PPP2R1A*, *APC*, *FBXW7*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *MLL2*, *RFF43* y *FGFR2*, y en el que, como mínimo, un miembro de cada par de cebadores está unido a una perla.

5 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que:

- (1) los pares de cebadores ceban la síntesis de un ácido nucleico de entre 240 y 300 pb;
- (2) los pares de cebadores ceban la síntesis de un ácido nucleico de entre 200 y 325 pb; o
- (3) los pares de cebadores ceban la síntesis de un ácido nucleico de entre 60 y 1000 pb.

10 11. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la sonda, o como mínimo, un cebador de cada par de cebadores comprende, como mínimo, 20 nt de secuencia complementaria a uno del panel de genes.

15 12. Procedimiento, según la reivindicación 1, que utiliza un soporte sólido que comprende, como mínimo, 10 sondas unidas a él, en el que cada sonda en el soporte sólido comprende, como mínimo, 15 nt de secuencia complementaria a uno del panel de genes, en el que el panel se selecciona del grupo que comprende *CTNNB1*, *EGFR*, *PI3KCA*, *PTEN*, *TP53*, *BRAF*, *KRAS*, *AKT1*, *NRAS*, *PPP2R1A*, *APC*, *FBXW7*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *MLL2*, *RFF43* y *FGFR2*, en el que el panel es acumulativamente complementario a, como mínimo, 10 genes diferentes.

20 13. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que:

(1) la etapa de prueba se realiza incrementando la sensibilidad de los instrumentos de secuenciación masiva en paralelo con una técnica de reducción de error que permite la detección de 1 modelo mutante de entre hasta 1.000.000 de modelos de tipo silvestres; o

25 (2) la etapa de prueba se realiza incrementando la sensibilidad de los instrumentos de secuencia masiva en paralelo con una técnica de reducción de error que incluye la amplificación de cada molécula modelo marcada de forma única para crear familias de UID.

30 14. Kit para analizar un panel de genes en muestras endocervicales de cánceres o neoplasmas de ovario, el kit comprendiendo sondas o parejas de cebadores en los que cada sonda o cada cebador de la pareja de cebadores en el kit comprende, como mínimo, 15 nt de secuencia complementaria a uno del panel de genes, en los que el panel consiste en *CTNNB1*, *EGFR*, *PI3KCA*, *PTEN*, *TP53*, *BRAF*, *KRAS*, *AKT1*, *NRAS*, *PPP2R1A*, *APC*, *FBXW7*, *ARID1A*, *CDKN2A*, *MLL2*, *RFF43* y *FGFR2*, y en los que las sondas o parejas de cebadores son acumulativamente complementarios a al menos cada uno de los *CTNNB1*, *EGFR*, *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53*, *BRAF*, *KRAS*, *AKT1*, *NRAS*, *PPP2R1A*, *APC* y *FBXW7*.

35 15. Kit, según la reivindicación 14, en el que las sondas están biotiniladas o unidas a un soporte sólido, o en el que al menos un miembro de cada par de cebadores está unido a un soporte sólido.

40 16. Kit, según la reivindicación 15, en el que el soporte sólido es una perla o una matriz.

17. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que cada cebador comprende una etiqueta universal 5' para la amplificación universal.

45 18. Kit, según la reivindicación 17, en el que un cebador de cada par de cebadores comprende un identificador único interpuesto entre la etiqueta universal 5' y los al menos 15 nt de secuencia complementaria.

19. Kit, según la reivindicación 18, en el que el identificador único comprende 14 bases N degeneradas.

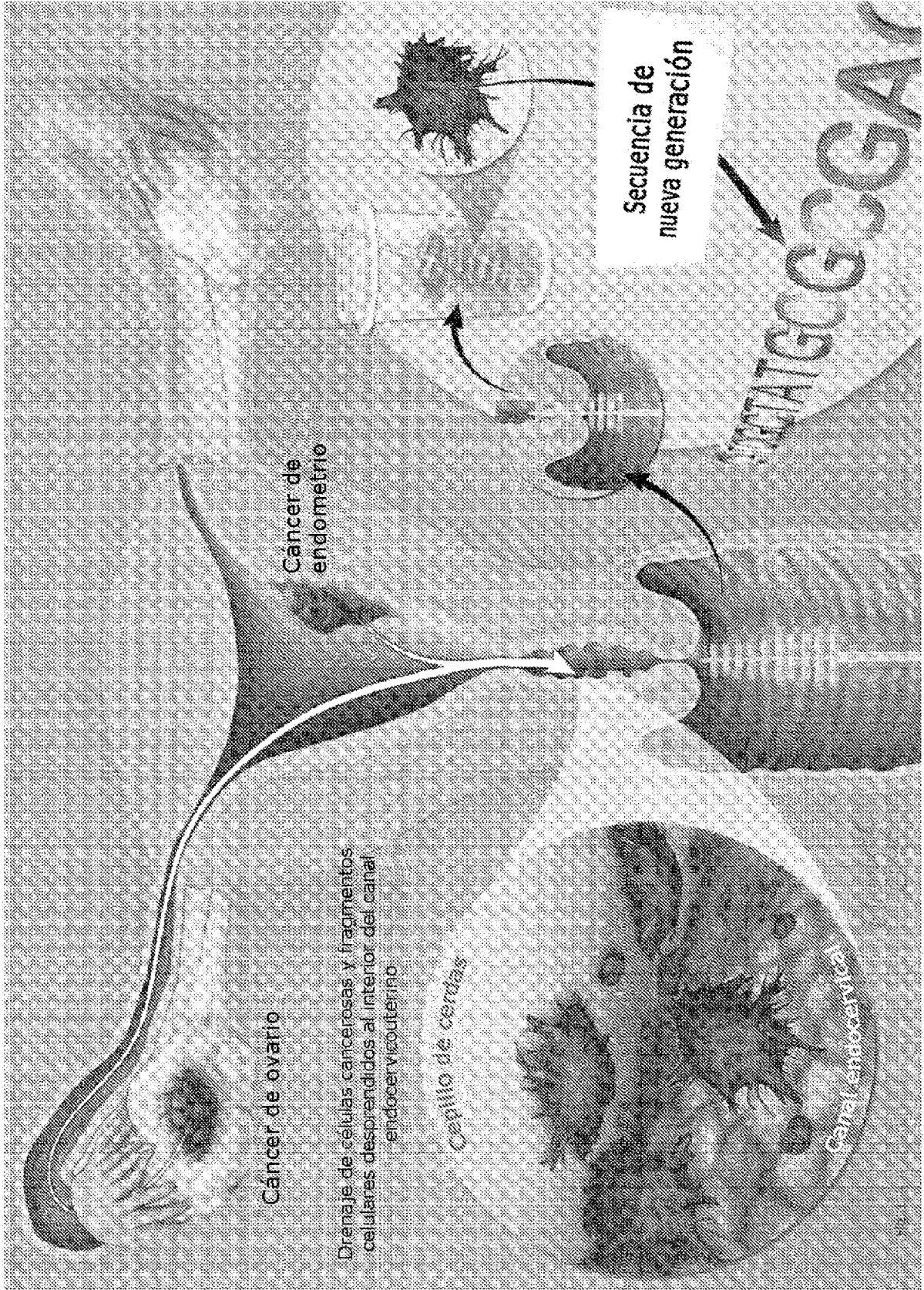


Fig. 1

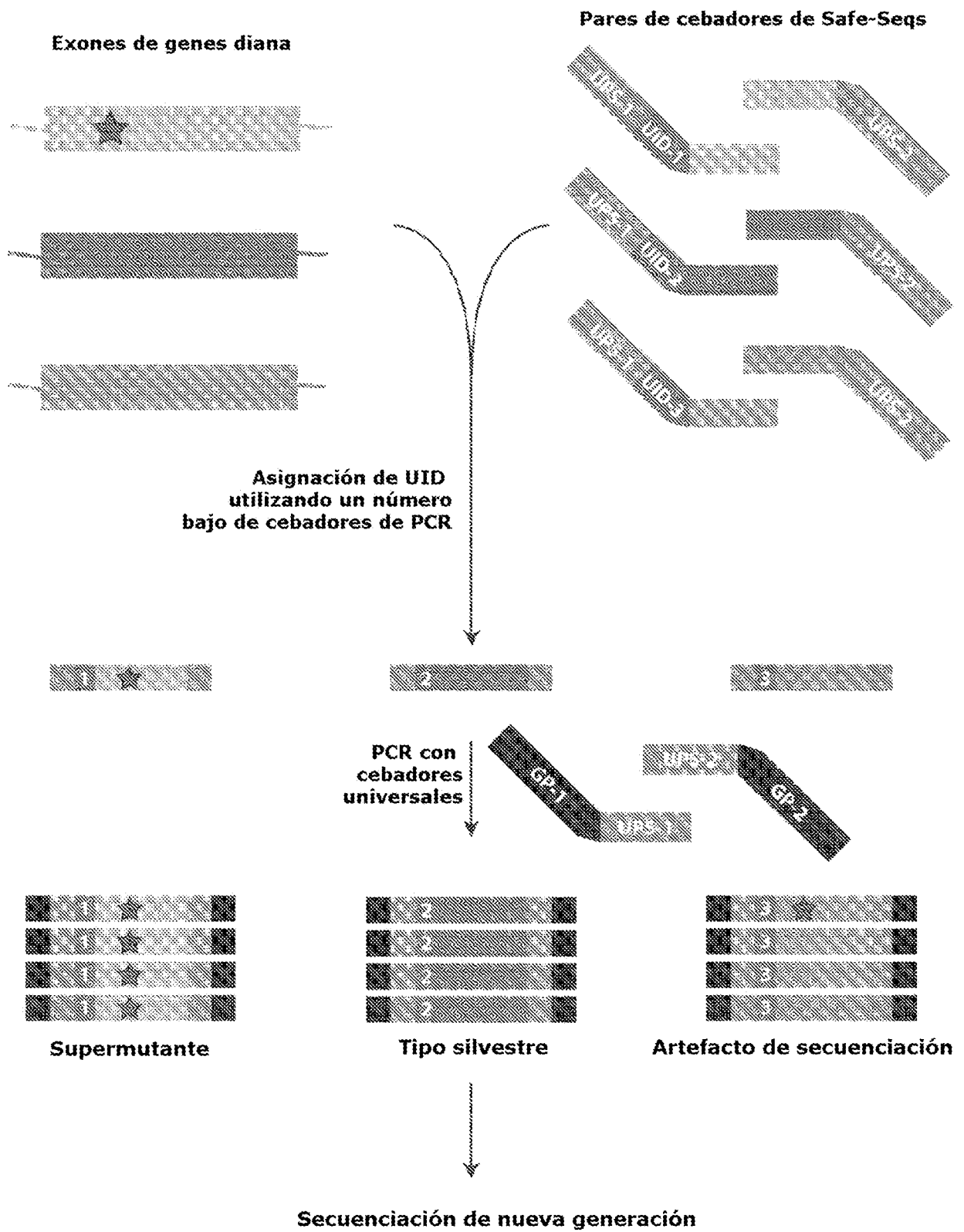


Fig. 2

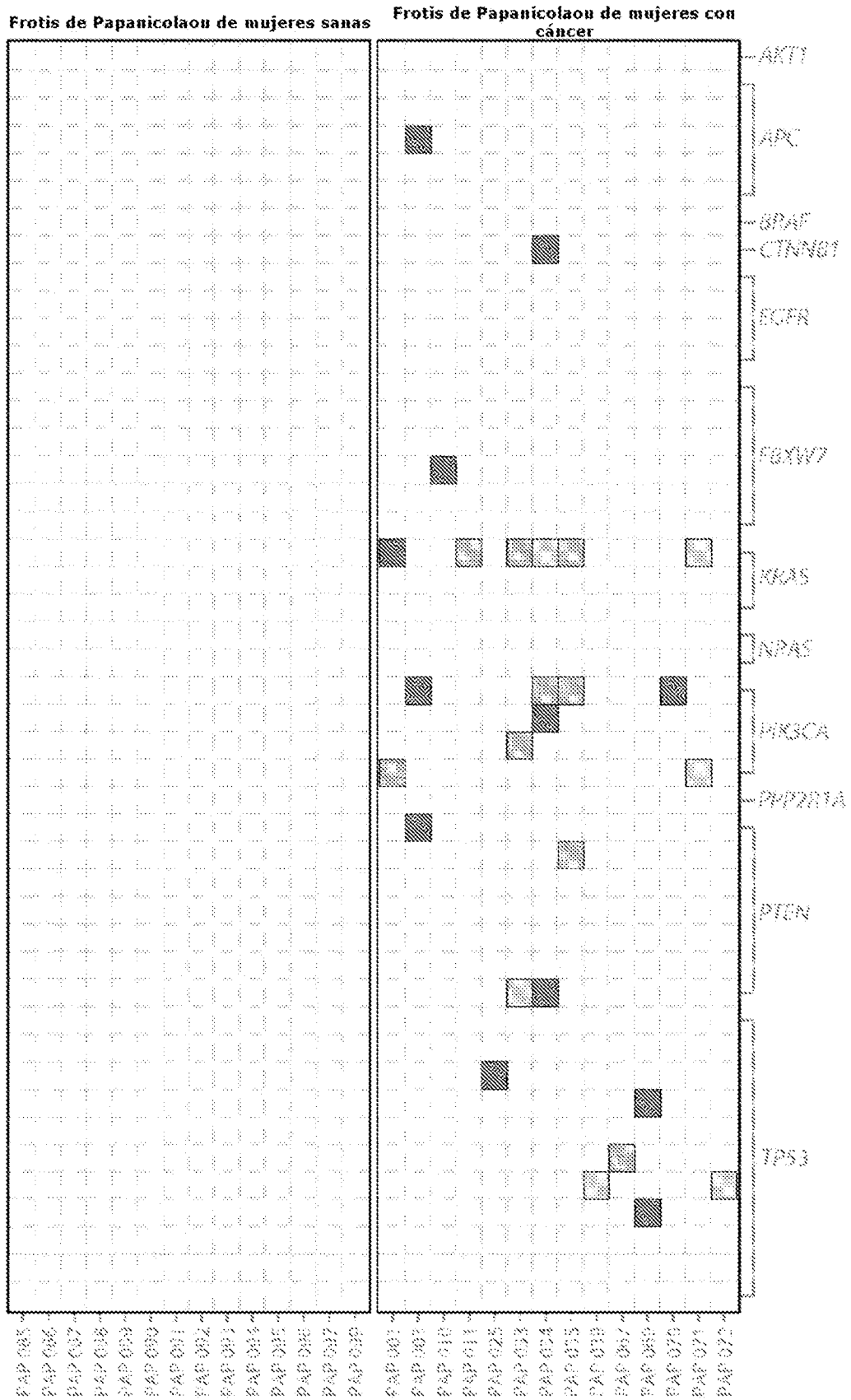


Fig. 4

Tabla 1 - Epidemiología de tumores de ovario y de endometrio

Tejido	Tipo	Subtipo	Fracción del total	Nuevos casos estimados en los EE.UU., 2012	Muertes estimadas en los EE.UU., 2012	Supervivencia durante 5 años	Nº de referencia
Ovario	Epitelial	Seroso de alta malignidad	60%	13,336	6,224	9%	43, 44
		Endometriode	16%	3,342	2,373	71%	43, 46
		Células claras	10%	2,228	1,381	62%	43, 46
		Seroso de baja malignidad	9%	1,782	1,105	40%	43, 44
		Mucinoso	2%	446	346	65%	43, 46
		Otro	3%	1,114	722	N/A	43, 44, 46
Endometrio	Tipo I: Endometriode Tipo II: no endometriode	Endometriode	95%	40,360	5,160	91%	43, 45
		Seroso papilar	10%	4,713	2,194	45%	43, 45
		Células claras	5%	2,357	650	63%	43, 46

Fig. 5

Tabla 2 - Características genéticas de cánceres de ovario y de endometrio

Tejido	Tipo	Subtipo	Mutaciones comunes (frecuencia)	Nº de referencia		
Ovario	Epitelial	Seroso de alta malignidad Endometriode	TP53 (96%)	23		
			TP53 (68%)	28		
			ARID1A (30%)	28		
			CTNND1 (26%)	28		
			PTEN (17%)	29		
			PIK3CA (15%)	28		
			KRAS (10%)	28		
			PPP2R1A (11%)	28		
		Células claras	CDKN2A (12%)	28		
			BRAF (8%)	29		
			ARID1A (57%)	24		
			PIK3CA (40%)	24		
		Seroso de baja malignidad	PPP2R1A (7.1%)	24		
			KRAS (4.7%)	24		
			BRAF (39%)	25		
			KRAS (19%)	25		
Mucinoso	TP53 (56%)	25				
	KRAS (40%)	25				
	PPP2R1A (23%)	25				
	CDKN2A (16%)	25				
			PTEN (11%)	25		
<hr/>						
Tejido	Tipo	Subtipo	Mutaciones comunes (frecuencia)	Nº de referencia		
Endometrio	Tipo I: endometriode	Endometriode	PTEN (34%)	Estudio actual		
			PIK3CA (39%)	Estudio actual		
			ARID1A (35%)	Estudio actual		
			CTNND1 (32%)	Estudio actual		
			MLL2 (32%)	Estudio actual		
			FBXW7 (27%)	Estudio actual		
			RNF43 (27%)	Estudio actual		
			APC (23%)	Estudio actual		
			FGFR2 (18%)	Estudio actual		
			KRAS (9%)	Estudio actual		
			PIK3R1 (9%)	Estudio actual		
			EGFR (14%)	Estudio actual		
			AKT1 (5%)	Estudio actual		
	NRAS (5%)	Estudio actual				
	Tipo II: no endometriode	Seroso papilar		TP53 (5%)	Estudio actual	
				TP53 (81,6%)	29	
				PIK3CA (24%)	29	
				FBXW7 (19,7%)	29	
				PPP2R1A (18,4%)	29	
		Células claras			TP53 (46%)	29
					PPP2R1A (33%)	28
					PIK3CA (29%)	28
					PTEN (13%)	28
PIK3R1 (9%)					25	
			KRAS (5%)	25		

Fig. 6

Tabla S1: Cánceres de endometrio (subtipo endometriode) estudiados mediante secuenciación de todo el exoma

ID del tumor	Edad	Estadio (FIGO)	Estadio patológico (clase TNM)	Número de mutaciones	Estado de estabilidad de microsatélites*
PAP 003	53	IB	T1bN0M0	847	MSS
PAP 010	73	IB	T1bN0M1	29	MSS
PAP 011	58	IB	T1bN0M2	579	MSI-H
PAP 024	56	IA	T1aN0	7	MSS
PAP 026	86	IA	T1a	769	MSI-H
PAP 030	73	IA	T1aNx	49	MSS
PAP 031	61	IA	T1aNx	41	MSS
PAP 032	82	IA	T1aNx	9	MSS
PAP 033	68	IA	T1aNx	34	MSS
PAP 034	55	IA	T1aN0	454	MSI-H
PAP 043	55	IB	T1bN0Mx	26	MSS
PAP 045	57	IB	T1bN0Mx	4629	MSS
PAP 046	44	IIA	T2ANxMx	40	MSS
PAP 047	53	IA	T1AN0Mx	1767	MSS
PAP 048	62	IIIC	T2AN1Mx	394	MSI-H
PAP 049	45	IIIB	T2BN0Mx	20	MSS
PAP 050	39	IB	T1bN0Mx	50	MSS
PAP 052	70	IVB	T1AN1M1	164	MSI-H
PAP 053	66	IB	T1bN0Mx	1102	MSI-H
PAP 054	73	IA	T1ANxMx	413	MSI-H
PAP 055	61	IA	T1AN0Mx	1195	MSS
PAP 057	59	IIIB	T2BN0Mx	176	MSI-H

* MSI-H: microsatélite inestable; MSS: microsatélite estable. Véase materiales y procedimientos

Fig. 7

Tabla S6. Mutaciones identificadas en frotis de Papanicolau a través de evaluación simultánea de 12 genes

Nº de caso	Tipo de tumor	Nombre del gen afectado	ID del gen mutado	Nucleótido (genómico)*	Transcrito	Nucleótido (transcrito)*	Aminocido (proteína)	Tipo de mutación	Fracción de células mutantes en frotis de Papanicolau
PAP 001	Endometrio	KRAS	EN5500000134968	g.401.233.289531C>G	CCGAGGCG	c.355>C	p.G.12A	Sentido alterado	12,51%
		PKC3CA	EN5600000322879	g.401.233.189534779A>G	CCCGAAGTCT	c.3110A>G	p.L1027R	Sentido alterado	5,74%
PAP 003	Endometrio	PKC3CA	EN5500000115179	g.401.233.189534783A>A	CCCGAAGTCT	c.2836>A	p.R88D	Sentido alterado	11,58%
		APC	EN5500000134962	g.401.233.1726578C>T	CCCGAAGTCT	c.4362>T	p.E1452Y	Sentido alterado	12,36%
		PTEN	EN5600000174862	g.401.233.14243A>T	CCCGAAGTCT	c.284>C	p.K11T	Sentido alterado	12,38%
PAP 010	Endometrio	PTEN	EN5600000108679	g.401.233.14243A>T	CCCGAAGTCT	c.1319C>T	p.R499K	sin sentido	20,18%
PAP 011	Endometrio	KRAS	EN5500000122793	g.401.233.289531C>G	CCCGAAGTCT	c.355>C	p.G.12A	Sentido alterado	3,12%
PAP 020	Endometrio	TP53	EN5600000146310	g.401.233.752012A>G	CCCGAAGTCT	c.2423G>C	Desplazamiento del marco	15,82%	
PAP 031	Endometrio	PKC3CA	EN5600000121879	g.401.233.189534337G>G	CCCGAAGTCT	c.3011T>G	p.V0>445	Sentido alterado	1,72%
		KRAS	EN5500000134970	g.401.233.289531C>A	CCCGAAGTCT	c.353>T	p.G.12V	Sentido alterado	4,13%
		PTEN	EN5600000174862	g.401.233.14243A>T	CCCGAAGTCT	c.682A>C	Desplazamiento del marco	9,87%	
PAP 301	Endometrio	PKC3CA	EN5600000124879	g.401.233.189534605A>A	CCCGAAGTCT	c.2219>A	p.R420H	Sentido alterado	22,78%
		CTNNA1	EN5600000108656	g.401.233.10789A>A	CCCGAAGTCT	c.1006>A	p.G34R	Sentido alterado	18,81%
PAP 304	Endometrio	PTEN	EN5600000174862	g.401.233.14243A>T	CCCGAAGTCT	c.2950A>A	Desplazamiento del marco	3,29%	
		PKC3CA	EN5600000124879	g.401.233.189534611G>G	CCCGAAGTCT	c.2077>G	p.F83V	Sentido alterado	4,49%
		KRAS	EN5500000134973	g.401.233.289531C>T	CCCGAAGTCT	c.356>A	p.G.12D	Sentido alterado	6,92%
		KRAS	EN5500000134970	g.401.233.289531C>T	CCCGAAGTCT	c.356>A	p.G.12D	Sentido alterado	5,83%
PAP 305	Endometrio	PKC3CA	EN5500000124879	g.401.233.189534611G>A	CCCGAAGTCT	c.2416>A	p.E81R	Sentido alterado	5,57%
		PTEN	EN5600000174862	g.401.233.14243A>T	CCCGAAGTCT	c.2077>C	p.H94I	Sentido alterado	4,73%
PAP 306	Ovario	TP53	EN5600000146310	g.401.233.752012A>G	CCCGAAGTCT	c.673A>C	Desplazamiento del marco	0,73%	
PAP 307	Endometrio	TP53	EN5600000146310	g.401.233.752012A>G	CCCGAAGTCT	c.637C>T	p.R213K	sin sentido	2,11%
		PTEN	EN5600000174862	g.401.233.14243A>T	CCCGAAGTCT	c.278>T	p.R37C	Sentido alterado	19,73%
		TP53	EN5600000146310	g.401.233.752012A>G	CCCGAAGTCT	c.313C>T	p.R269R	sin sentido	13,96%
PAP 308	Endometrio	PKC3CA	EN5500000134976	g.401.233.189534611G>A	CCCGAAGTCT	c.2036>A	p.R82I	Sentido alterado	28,15%
PAP 309	Endometrio	KRAS	EN5500000134973	g.401.233.289531C>T	CCCGAAGTCT	c.350>A	p.G.12D	Sentido alterado	0,16%
PAP 310	Endometrio	PKC3CA	EN5600000124879	g.401.233.189534611G>G	CCCGAAGTCT	c.3140A>A	p.L1047R	Sentido alterado	0,33%
PAP 311	Ovario	TP53	EN5600000146310	g.401.233.752012A>G	CCCGAAGTCT	c.734G>A	p.G245D	Sentido alterado	0,54%

*Las coordenadas se refieren a la liberación del genoma humano de referencia hg18 (NCBI 36, 1 de marzo de 2008)

Fig. 11

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 2005136405 A1

Literatura no patente citada en la descripción

- **GEORGIOS PAPANICOLAOU**. *Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear*, 1943
- European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. **M. ARBYN ; A. ANTTILA ; J. JORDAN ; G. RONCO ; U. SCHENCK ; N. SEGNAH ; H. WIENER ; A. HERBERT ; L. VON KARSA**. *Ann Oncol*, 2010, vol. 21, 448-458
- **R. M. DEMAY**. *Practical principles of cytopathology*. ASCP Press, 2010, 402
- **F. BRAY ; J. S. REN ; E. MASUYER ; J. FERLAY**. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, 2012
- **J. FERLAY ; H.R. SHIN ; F. BRAY ; D. FORMAN ; C. MATHERS ; D.M. PARKIN**. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. *IARC CancerBase No. 10*, 2010
- **S. B. SAMS ; H. S. CURRENS ; S. S. RAAB**. Liquid-based Papanicolaou tests in endometrial carcinoma diagnosis. Performance, error root cause analysis, and quality improvement. *Am J Clin Pathol*, 2012, vol. 137, 248-254
- **P. SMITH ; O. BAKOS ; G. HEIMER ; U. ULMSTEN**. Transvaginal ultrasound for identifying endometrial abnormality. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1991, vol. 70, 591-594
- **H. MITCHELL ; G. GILES ; G. MEDLEY**. Accuracy and survival benefit of cytological prediction of endometrial carcinoma on routine cervical smears. *Int J Gynecol Pathol*, 1993, vol. 12, 34-40
- **K. J. CARLSON ; S. J. SKATES ; D. E. SINGER**. Screening for ovarian cancer. *Ann Intern Med*, 1994, vol. 121, 124-132
- **H. MEDEN ; A. FATTAHI-MEIBODI**. CA 125 in benign gynecological conditions. *Int J Biol Markers*, 1998, vol. 13, 231-237
- **S. S. BUYS ; E. PARTRIDGE ; A. BLACK ; C. C. JOHNSON ; L. LAMERATO ; C. ISAACS ; D. J. REDING ; R. T. GREENLEE ; L. A. YOKOCHI ; B. KESSEL**. Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 2011, vol. 305, 2295-2303
- ACOG Practice Bulletin. Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists. Number 60, March 2005. Pregestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol*, 2005, vol. 105, 675-685
- **E. PARTRIDGE ; A. R. KREIMER ; R. T. GREENLEE ; C. WILLIAMS ; J. L. XU ; T. R. CHURCH ; B. KESSEL ; C. C. JOHNSON ; J. L. WEISSFELD ; C. ISAACS**. Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial. *Obstet Gynecol*, 2009, vol. 113, 775-782
- Detailed guide: ovarian cancer - can ovarian cancer be found early?. American Cancer Society
- Screening for ovarian cancer: recommendation statement. U.S. Preventive Services Task Force. *Am Fam Physician*, 2005, vol. 71, 759-762
- ACOG Committee Opinion: number 280, December 2002. The role of the generalist obstetrician-gynecologist in the early detection of ovarian cancer. *Obstet Gynecol*, 2002, vol. 100, 1413-1416
- *National Comprehensive Cancer Network Practice Guidelines in Oncology: ovarian cancer and genetic screening*, http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/genetics_screening.pdf
- **N. M. LINDOR ; G. M. PETERSEN ; D. W. HADLEY ; A. Y. KINNEY ; S. MIESFELDT ; K. H. LU ; P. LYNCH ; W. BURKE ; N. PRESS**. Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review. *JAMA*, 2006, vol. 296, 1507-1517
- **J. P. MARQUES ; L. B. COSTA ; A. P. PINTO ; A. F. LIMA ; M. E. DUARTE ; A. P. BARBOSA ; P. L. MEDEIROS**. Atypical glandular cells and cervical cancer: systematic review. *Rev Assoc Med Bras*, 2011, vol. 57, 234-238
- **R. P. INSINGA ; A. G. GLASS ; B. B. RUSH**. Diagnoses and outcomes in cervical cancer screening: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, vol. 191, 105-113
- **K. E. SHARPLESS ; P. F. SCHNATZ ; S. MANDAVILLI ; J. F. GREENE ; J. I. SOROSKY**. Dysplasia associated with atypical glandular cells on cervical cytology. *Obstet Gynecol*, 2005, vol. 105, 494-500

- **C. P. DESIMONE ; M. E. DAY ; M. M. TOVAR ; C. S. DIETRICH, 3RD ; M. L. EASTHAM ; S. C. MODESITT.** Rate of pathology from atypical glandular cell Pap tests classified by the Bethesda 2001 nomenclature. *Obstet Gynecol*, 2006, vol. 107, 1285-1291
- **C. S. GEIER ; M. WILSON ; W. CREASMAN.** Clinical evaluation of atypical glandular cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, vol. 184, 64-69
- Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 2011, vol. 474, 609-615 [0069]
- **S. JONES ; T. L. WANG ; M. SHIH IE ; T. L. MAO ; K. NAKAYAMA ; R. RODEN ; R. GLAS ; D. SLAMON ; L. A. DIAZ, JR. ; B. VOGELSTEIN.** Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science*, 2010, vol. 330, 228-231
- **S. JONES ; T. L. WANG ; R. J. KURMAN ; K. NAKAYAMA ; V. E. VELCULESCU ; B. VOGELSTEIN ; K. W. KINZLER ; N. PAPADOPOULOS ; M. SHIH IE.** Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *J Pathol*, 2012, vol. 226, 413-420
- **S. A. FORBES ; N. BINDAL ; S. BAMFORD ; C. COLE ; C. Y. KOK ; D. BEARE ; M. JIA ; R. SHEPHERD ; K. LEUNG ; A. MENZIES.** COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res*, 2011, vol. 39, D945-950
- **E. BARROW ; L. ROBINSON ; W. ALDUAJ ; A. SHENTON ; T. CLANCY ; F. LALLOO ; J. HILL ; D. G. EVANS.** Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet*, 2009, vol. 75, 141-149
- **K. ODA ; D. STOKOE ; Y. TAKETANI ; F. MCCORMICK.** High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res*, 2005, vol. 65, 10669-10673
- **E. KUHN ; R. C. WU ; B. GUAN ; G. WU ; J. ZHANG ; Y. WANG ; L. SONG ; X. YUAN ; L. WEI ; R. B. RODEN.** Identification of Molecular Pathway Aberrations in Uterine Serous Carcinoma by Genome-wide Analyses. *J Natl Cancer Inst*, 2012
- **I. KINDE ; J. WU ; N. PAPADOPOULOS ; K. W. KINZLER ; B. VOGELSTEIN.** Deletion and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, vol. 108, 9530-9535
- **H. F. TRAUT ; G. N. PAPANICOLAOU.** Cancer of the Uterus: The Vaginal Smear in Its Diagnosis. *Cal West Med*, 1943, vol. 59, 121-122
- **B. VOGELSTEIN ; K. W. KINZLER.** Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 2004, vol. 10, 789-799
- **J. M. COOPER ; M. L. ERICKSON.** Endometrial sampling techniques in the diagnosis of abnormal uterine bleeding. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2000, vol. 27, 235-244
- **C. C. GUNDERSON ; A. N. FADER ; K. A. CARSON ; R. E. BRISTOW.** Oncologic and reproductive outcomes with progestin therapy in women with endometrial hyperplasia and grade 1 adenocarcinoma: a systematic review. *Gynecol Oncol*, 2012, vol. 125, 477-482
- **R. E. BRISTOW ; R. S. TOMACRUZ ; D. K. ARMSTRONG ; E. L. TRIMBLE ; F. J. MONTZ.** Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol*, 2002, vol. 20, 1248-1259
- **M. H. MAYRAND ; E. DUARTE-FRANCO ; I. RODRIGUES ; S. D. WALTER ; J. HANLEY ; A. FERENCZY ; S. RATNAM ; F. COUTLEE ; E. L. FRANCO.** Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med*, 2007, vol. 357, 1579-1588
- **P. NAUCLER ; W. RYD ; S. TORNBERG ; A. STRAND ; G. WADELL ; K. ELFGREN ; T. RADBERG ; B. STRANDER ; B. JOHANSSON ; O. FORSLUND.** Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med*, 2007, vol. 357, 1589-1597
- **S. PECORELLI.** Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*, 2009, vol. 105, 103-104
- **C. RAGO ; D. L. HUSO ; F. DIEHL ; B. KARIM ; G. LIU ; N. PAPADOPOULOS ; Y. SAMUELS ; V. E. VELCULESCU ; B. VOGELSTEIN ; K. W. KINZLER.** Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA. *Cancer Res*, 2007, vol. 67, 9364-9370
- **J. WU ; H. MATTHAEI ; A. MAITRA ; M. DAL MOLIN ; L. D. WOOD ; J. R. ESHLEMAN ; M. GOGGINS ; M. I. CANTO ; R. D. SCHULICK ; B. H. EDIL.** Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med*, 2011, vol. 3, 92-66
- **J. HE ; J. WU ; Y. JIAO ; N. WAGNER-JOHNSTON ; R. F. AMBINDER ; L. A. DIAZ, JR. ; K. W. KINZLER ; B. VOGELSTEIN ; N. PAPADOPOULOS.** IgH gene rearrangements as plasma biomarkers in Non-Hodgkin's lymphoma patients. *Oncotarget*, 2011, vol. 2, 178-185
- **S. ROZEN ; H. SKALETSKY.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 2000, vol. 132, 365-386
- **N. HOWLADER ; A. M. NOONE ; M. KRAPCHO ; N. NEYMAN ; R. AMINOU ; S. F. ALTEKRUSE ; C. L. KOSARY ; J. RUHL ; Z. TATALOVICH ; H. CHO.** SEER Cancer Statistics Review. National Cancer Institute, 1975

- **A. MALPICA ; M. T. DEEVERS ; K. LU ; D. C. BODURKA ; E. N. ATKINSON ; D. M. GERSHENSON ; E. G. SILVA.** Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol*, 2004, vol. 28, 496-504
- **L.A.G. RIES ; J.L. YOUNG ; G.E. KEEL ; M.P. EISNER ; Y.D. LIN ; M-J. HORNER.** SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: US SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics. National Cancer Institute. 2007
- **C. A. HAMILTON ; M. K. CHEUNG ; K. OSANN ; L. CHEN ; N. N. TENG ; T. A. LONGACRE ; M. A. POWELL ; M. R. HENDRICKSON ; D. S. KAPP ; J. K. CHAN.** Uterine papillary serous and clear cell carcinomas predict for poorer survival compared to grade 3 endometrioid corpus cancers. *Br J Cancer*, 2006, vol. 94, 642-646